

Efecto de la *Calendula officinalis* en la proliferación del fibroblasto gingival humano

Effect of Calendula officinalis on the Proliferation of Human Gingival Fibroblast

107

Univ Odontol. 2010 Jul-Dic; 29(63): 107-112. ISSN 0120-4319

CIENCIAS BÁSICAS, BIOTECNOLOGÍA Y BIOINFORMÁTICA

María Alejandra Madrid Ahumada

Odontóloga, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Luis Carlos Mahecha Donato

Odontólogo, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Viviana Andrea Oviedo Peñaloza

Odontóloga, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Margarita Chaves Clavijo

Bacterióloga. Magistra en Microbiología. Docente, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Nelly Stella Roa Molina

Odontóloga. Magistra en Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Candidata al Doctorado en Inmunología, Universidad Autónoma de México, Ciudad de México, México.

Dabeiba Adriana García Robayo

Bacterióloga. Magistra en Microbiología. Candidata al Doctorado en Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Gloria Cristina Moreno Abello

Odontóloga. Magistra en Microbiología. Docente, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Trabajo de grado de los tres primeros autores para optar al título de odontólogos, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

Madrid MA, Mahecha LC, Oviedo VA, Chaves M, Roa NS, García DA, Moreno GC. Efecto de la *Calendula officinalis* en la proliferación del fibroblasto gingival humano. Univ Odontol. 2010 Jul-Dic; 29(63): 107-112.

Recibido para publicación: 25-05-2010
Aceptado para publicación: 26-08-2010

Disponible en
<http://www.javeriana.edu.co/universitasodontologica>

RESUMEN

Antecedentes: la *Calendula officinalis* tiene múltiples propiedades terapéuticas, dentro de las que se encuentra su capacidad para mejorar procesos de cicatrización. Por ello resulta interesante estudiar su posible valor para tratar patologías orales. **Objetivo:** observar los efectos que producen tres presentaciones de *C. officinalis* en diferentes concentraciones en la proliferación de los fibroblastos gingivales humanos. **Método:** a fibroblastos gingivales humanos (FGH) en quinto pase, obtenidos de explantes de donantes sanos, se les realizaron estímulos con extracto etanólico de *C. officinalis* (EEC), tintura de *C. officinalis* (TC) y enjuague K-Trix® en concentraciones de 750, 500, 150, 100 µg/ml y se observó la proliferación de los FGH a las 12, 24 y 48 horas en relación con un grupo de células sin estimular, utilizando la prueba MTA con Cell Titer 96®. **Resultados:** el mayor efecto proliferativo se logró con el EEC en concentraciones de 750 y 500 µg/ml a las 12 horas. La TC a 100 y 150 µg/ml a las 48 horas inhibió el crecimiento, mientras que el enjuague K-Trix® no tuvo efecto en la proliferación de los FGH en ninguna concentración en ningún tiempo. **Conclusión:** la proliferación de los FGH depende de la presentación de la *C. officinalis*, del tiempo y de la concentración.

PALABRAS CLAVE

Calendula officinalis, cicatrización, enjuague fibroblasto, extracto etanólico, proliferación celular, tintura.

PALABRAS CLAVES DESCRIPTOR

Fibroblastos, microbiología, proliferación celular, cicatrización de heridas, caléndula inmunología, periodoncia

ÁREA TEMÁTICA

Periodoncia.

ABSTRACT

Background: *Calendula officinalis* has multiple therapeutic properties such as improving the process of cicatrization. Therefore, it is interesting its possible value and use to treat oral pathologies. **Objective:** To observe the effect of three presentations of *C. officinalis* in different concentrations on the proliferation of the human gingival fibroblasts. **Methods:** Human Gingival Fibroblasts (FGH) in fifth pass were obtained from healthy donor explants and exposed to stimuli with ethanolic extract of *C. officinalis* (EEC), tincture of *C. officinalis* (TC) and K-Trix® rinsing in concentrations of 750, 500, 150, 100 µg/ml. Proliferation of the FGH was observed at 12, 24 and 48 hours in relation with a group of cells without getting any stimulation, using the MTA test with Cell Titer 96®. **Results:** The major proliferative effect was achieved by the EEC in concentrations of 750 and 500 µg/ml at 12 hours. The tincture of 100 and 150 µg/ml *C. officinalis* at 48 hours generated inhibition in cell growth whereas the rinsing K-Trix® did not have effect on the proliferation of the FGH in any concentration at any time. **Conclusion:** The proliferation of the FGH depends on the presentation of the *C. officinalis*, time, and concentration.

KEY WORDS

Calendula officinalis, cell proliferation, dyeing, ethanol extract, fibroblast, rinse, wound healing.

KEY WORDS PLUS

Fibroblasts, Microbiology, Cell Proliferation, Wound Healing, Calendula, Immunology, Periodontics

THEMATIC FIELD

Periodontics.

INTRODUCCIÓN

La búsqueda por mejorar estilos de vida incluye el uso de alternativas naturales provenientes de las plantas, utilizadas como antibióticos, antiinflamatorios y, más recientemente, como cicatrizantes. La cicatrización no es un fenómeno aislado y su evolución está condicionada por factores bioquímicos locales, cambios en las estructuras tisulares y ciertos procesos que determinan la formación de la cicatriz.¹

Los fibroblastos son células que participan activamente en los procesos de cicatrización cuando proliferan y depositan fibrina y tropocolágeno e inician la reparación de la herida.² Los fibroblastos se originan localmente y a través de las células mesenquimáticas pluripotenciales, que comienzan la producción de tropocolágeno al tercer o cuarto días después de la lesión.² El fibroblasto presenta características particulares de acuerdo con el tejido en el que se encuentre.³ El de tipo gingival desempeña un papel importante durante los procesos de cicatrización y regeneración periodontal, por medio de una respuesta proliferativa activa, además de otros fenómenos celulares y moleculares.⁴ Esta respuesta proliferativa es inducida por diferentes factores de crecimiento presentes en el plasma y en los gránulos plaquetarios.⁵

En medicina popular, la *Calendula officinalis* se usa para mejorar la cicatrización. La palabra *caléndula* viene de las calendas del latín, que designaban el primer día del mes. Es así porque la *C. officinalis* florece todos los meses del año, incluso los de invierno, siempre y cuando el invierno sea leve.⁶ También es conocida como maravilla y se ha usado extensamente en la piel para tratar heridas pequeñas, infecciones de la piel, quemaduras, picaduras de abeja, quemaduras de sol, verrugas y cáncer. La mayor parte de la evidencia científica, en cuanto a su efectividad como agente para curar heridas, se basa en estudios con animales, mientras que las investigaciones en seres humanos son pocas.⁶⁻⁹

Las flores de *C. officinalis* constituyen la parte de la planta más utilizada. Los compuestos activos primarios de la planta incluyen triterpenos (antiinflamatorios) y flavonoides, aceites esenciales, saponinas, mucílagos y sustancias amargas como la calendina. Estos componentes son algunos de los principios activos que le confieren a la *C. officinalis* sus propiedades antiinflamatoria, antiséptica, cicatrizante, desintoxicante y fungicida.¹⁰ Recientes estudios de investigación en laboratorio indican que los péta-

los de la *C. officinalis* tienen propiedades antibacterianas y antivirales, antiinflamatorias, astringentes y antisépticas, y pueden incluso ofrecer acciones inmunoestimulantes y propiedades antiespasmódica y antiulcerosa.¹¹⁻¹³

También se han demostrado efectos de la *C. officinalis* en células como el linfocito TCD4. Un extracto acuoso de la planta inhibió la transcriptasa reversa en linfocitos de sangre periférica humana; además, se encontraron efectos inhibitorios y actividad antiinflamatoria.¹² En fibroblastos gingivales no se conocen investigaciones sobre el efecto de la *C. officinalis*. Por ello, el objetivo de la presente investigación fue observar los efectos que producen tres presentaciones de la *C. officinalis* en diferentes concentraciones en la proliferación de fibroblastos gingivales humanos para aportar información que sustente el efecto de esta planta en los procesos de cicatrización periodontal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de fibroblastos gingivales humanos

Previo cumplimiento de las normas éticas para la investigación sobre seres humanos, que incluyeron el diligenciamiento del consentimiento informado, se obtuvo una muestra de tejido gingival producto de una cirugía realizada por fines estéticos en un paciente joven sin afectaciones sistémicas ni presencia de inflamación gingival. Los autores no tienen ningún tipo de conflicto de intereses en la elaboración de este estudio. Los fibroblastos fueron obtenidos a partir de explantes del tejido gingival. Los ensayos de proliferación se realizaron con fibroblastos gingivales humanos (FGH) en quinto pase. La prueba se realizó por triplicado.

Soluciones de *C. officinalis*

La fórmula magistral del extracto etanólico de *C. officinalis* (EEC) 1:1 (50%) fue provista por el laboratorio Labfarve. Para los ensayos se extrajo el componente alcohólico con un rotavapor. La fórmula magistral de la tintura de *C. officinalis* (TC) al 20% se obtuvo igualmente del laboratorio Labfarve, lote 37708200.

El enjuague Womercial que contiene extracto de *C. officinalis* al 0,20%. Para los estímulos se realizaron las diluciones de 750, 500, 150, 100 µg/ml de cada presentación de *C. officinalis* en medio de cultivo sin suero fetal bovino.

Estímulos de *C. officinalis*

En placas de 96 pozos se sembraron 5.000 células por pozo, a las cuales se le añadieron 200 µl de medio completo suplementado con SFB 10%. Se incubaron durante 12 horas para lograr adherencia, que se verificó microscópicamente. Las células se estimularon con cada una de las presentaciones EEC, TC y enjuague, en cada una de las concentraciones de *C. officinalis* (750, 500, 150, 100 µg/ml). Como control se tuvieron células sin estímulo.

Las lecturas de proliferación celular y viabilidad fueron realizadas a las 12, a las 24 y a las 48 horas mediante el reactivo CellTiter 96® AQueous (Promega). Se adicionaron 10 µl de CellTiter más 50 µl del medio basal de Eagle (MEM) modificado por Dulbeco (DMEM) sin suplementar a cada pozo, y después de 2 horas de incubación a 37 °C, las placas fueron leídas en un microlector de ELISA a 490 nm.

El efecto de las diferentes presentaciones de *C. officinalis* en distintas concentraciones sobre los cultivos de FGH fue comparado con la proliferación celular de los fibroblastos del grupo sin estímulo. Se determinó que el 100% de proliferación equivalía a la absorbancia de las células del grupo control, y se calculó la proliferación de cada pozo según la fórmula:

$$TP = DO \text{ problema} \times 100 / DO \text{ control} =$$

(% sobre el control)

Donde:

TP: tasa de proliferación.

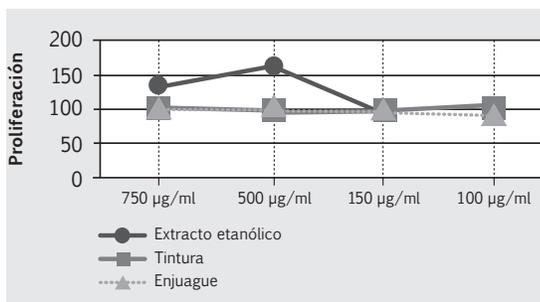
DO: densidad óptica.

Para el análisis de los datos de proliferación se utilizó estadística descriptiva que incluyó promedios y desviación estándar.

RESULTADOS

Los resultados a las 12 horas mostraron un aumento del 61% en la proliferación celular con el uso del EEC a una concentración de 500 µg/ml, y con una concentración de 750 µg/ml el aumento correspondió al 31%, al ser comparados con el grupo control. Las otras presentaciones TC y enjuague no mostraron ningún cambio en las diferentes concentraciones sobre la proliferación del FGH (figura 1).

FIGURA 1
EFECTO DE *C. OFFICINALIS* SOBRE FGH A LAS 12 HORAS



Los resultados a las 24 horas no mostraron cambios en la proliferación celular en ninguna de las presentaciones ni en ninguna concentración al ser comparada con el grupo control de FGH (figura 2). Los resultados del EEC y del enjuague a las 48 horas mostraron una leve inhibición de la proliferación, comparados con el grupo control. La TC en las concentraciones de 150 y 100 µg/ml inhibió el crecimiento celular, al compararla con las demás concentraciones y las demás presentaciones (figura 3).

FIGURA 2
EFECTO DE *C. OFFICINALIS* SOBRE FGH A LAS 24 HORAS

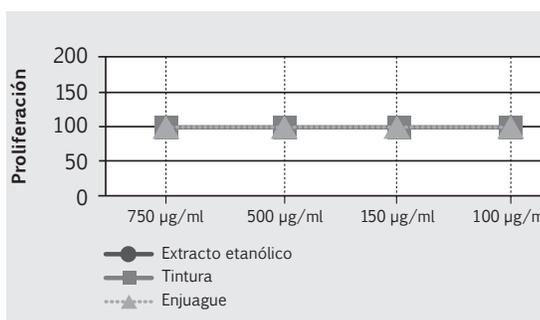
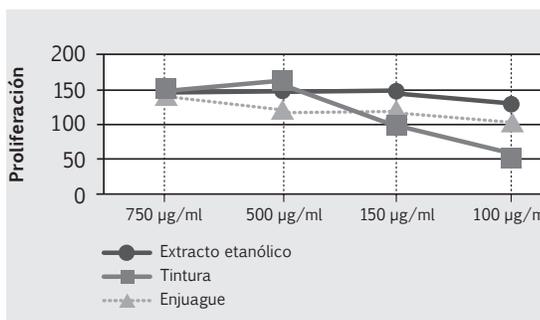


FIGURA 3
EFECTO DE *C. OFFICINALIS* SOBRE FGH A LAS 48 HORAS



Los resultados obtenidos mostraron que el enjuague de *C. officinalis* en general no mostró efectos proliferativos sobre los FGH con las diferentes concentraciones, a las 12 y 24 horas. A las 48 horas se produjo una inhibición que no superó el 10% tanto en concentraciones como en tiempos.

DISCUSIÓN

La *C. officinalis* es una planta muy usada en la medicina popular de Centroamérica, Suramérica, Europa y Asia occidental, y está contenida en medicamentos de origen vegetal que incluyen enjuagues orales, cremas dentales, ungüentos, entre otros. Dentro de las actividades biológicas de la *C. officinalis* se ha probado su efecto inmunomodulador,^{11,12} antitumoral,⁸ antibacteriano, antiinflamatorio^{8,12} y antiviral. Este estudio tuvo como objetivo observar los efectos que producen tres presentaciones de la *C. officinalis* en diferentes concentraciones en el proceso de proliferación de los fibroblastos gingivales humanos. Las tres presentaciones fueron EEC, TC y enjuague K-Trix®.

La obtención de extractos de *C. officinalis* varía en los procesos de extracción que puede lograrse por trituración, maceración o una mezcla de los dos, y la separación de los componentes se realiza utilizando agua o alcoholes, principalmente etanol y metanol en diferentes concentraciones. En consecuencia, se obtienen extractos acuosos,¹² etanólicos,¹¹ metanólicos⁸ o hidroalcohólicos. En la presente investigación el extracto de *C. officinalis* fue obtenido con etanol, y para retirar el componente alcohólico sin perder la solubilidad de los metabolitos de la planta se realizó un proceso de evaporación con rotavapor. La tintura utilizada fue una preparación magistral al 20%; entre tanto, el enjuague K-Trix®, cuyo componente activo es EEC, se obtuvo comercialmente.

Los resultados mostraron que el EEC fue el único producto que produjo efectos proliferativos; por el contrario, el enjuague mostró inhibición a las 48 horas, y la TC no alteró el crecimiento de los fibroblastos gingivales en cultivo. Esto sugiere que los procesos de obtención de la tintura (fórmula magistral) y el enjuague K-Trix® (producción industrial) pudieron afectar los metabolitos activos de la planta. Aunque en el proceso de extracción del etanol con el rotavapor se utiliza una temperatura de 60 °C, la obtención industrial del extracto para el enjuague probablemente usa temperaturas que degradan estos metabolitos, tal como lo señalan Jiménez-Medina y colaboradores,¹²

quienes muestran que temperaturas de 80 °C y 120 °C para esterilizar el extracto acuoso de *C. officinalis* tuvieron un efecto inhibitorio en la proliferación celular.

Más recientemente se ha estudiado un nuevo método de extracción acuosa que utiliza el láser para potenciar la extracción de los metabolitos activos de la *C. officinalis* y mejorar significativamente los efectos proliferativos de la planta.¹² Valdría la pena utilizar este método con *C. officinalis* cultivada en Colombia, considerando que la concentración y el tipo de metabolitos en la planta pueden variar por las condiciones ambientales.⁸

En este estudio, todas las presentaciones de la *C. officinalis* se evaluaron en dosis entre 100 y 750 µg/ml sobre cultivos de FGH. Estas concentraciones tomaron como punto de partida el estudio de Matysik y colaboradores, quienes reportaron efectos proliferativos del extracto metanólico de *C. officinalis* sobre fibroblastos de piel humana de diferentes extractos de *C. officinalis* (etanólicos, etilacetato y heptano), en concentraciones entre 25 y 250 µg/ml. Dicho estudio mostró un efecto diferencial asociado con la concentración y con el pico de mayor efectividad a los 125 µg/ml. Otras investigaciones han probado un efecto diferencial al usar concentraciones entre 15,52 µg/ml y 2 mg/ml, asociado al tipo celular sobre el que se genere el estímulo.^{8,12}

La presente investigación permitió observar el mayor efecto proliferativo del EEC en una concentración de 500 µg/ml. En concentraciones menores no tuvo ningún efecto proliferativo. Jiménez-Medina y colaboradores reportan que la concentración de mayor efectividad antitumoral correspondió al extracto acuoso de láser activado *Calendula Extract*, que fue de 250 µg/ml, al estimular seis líneas celulares diferentes.¹² También encontraron que los linfocitos proliferaron dos y tres veces más en concentraciones de 150, 250 y 500 µg/ml, al observar una proliferación del 36% en concentraciones de 250-500 µg/ml y del 17% en concentraciones de 15,62 µg/ml.¹²

Con referencia al tiempo, en esta investigación se observó un efecto proliferativo del EEC a 500 y 750 µg/ml sobre FGH a las 12 horas, efecto que se perdió a partir de las 24 horas. Este hallazgo es interesante, si se considera que los objetivos de base de este proyecto son mejorar los procesos de cicatrización periodontal con el uso de la *C. officinalis*, cuyo proceso de obtención no altere la actividad de los metabolitos, e identificar el efecto de estímulos consecutivos del extracto de *C. officinalis*.

La actividad farmacológica de la *C. officinalis* se asocia con metabolitos como flavonoides,¹² flavonoides glicosilados, carotenoides,¹³ triterpenos,¹⁴ polisacáridos arabinogalactanos¹⁴ y betaamilinas,⁸ aunque no es claro en la literatura cuál o cuáles metabolitos son responsables del efecto proliferativo. Se ha mostrado que el extracto acuoso de *C. officinalis* favorece la entrada de linfocitos de sangre periférica al ciclo celular (efecto proliferativo) y que en líneas celulares tumorales inhibe el crecimiento, al controlar el ciclo celular por activación de la caspasa-3, que favorece que las células tumorales entren en apoptosis.¹²

El estudio farmacológico de plantas se constituye en un campo de investigación interesante que se basa en sus propiedades terapéuticas y la facilidad de obtención. Este estudio da comienzo a una serie de trabajos que buscan profundizar en los efectos terapéuticos en odontología de la caléndula obtenida en Colombia.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El EEC mostró acción proliferativa en FGH a las 12 horas en las concentraciones más altas establecidas para esta investigación (750 y 500 µg/ml), sin comprometer la viabilidad en las concentraciones menores. La actividad proliferativa en FGH se asoció con la presentación, con la concentración y con el tiempo de exposición.

Se recomienda estudiar el efecto de la *C. officinalis* en el ciclo celular de FGH, al igual que el efecto de estimulaciones repetidas de *C. officinalis* en el FGH.

AGRADECIMIENTOS

A la doctora Sandra Gutiérrez, directora del Centro de Investigaciones odontológicas (CIO) de la Pontificia Universidad Javeriana, por facilitar el desarrollo de la investigación.

REFERENCIAS

- Peterson LJ, Hupp J, Ellis E, Tucker R. Contemporary of oral and maxillofacial surgery. St. Louis: Mosby; 1988.
- Schor SL, Ellis I, Irwin CR, Banyard J, Seneviratne K, Dolman C, Gilbert AD, Chisholm DM. Subpopulations of fetal-like gingival fibroblasts: characterisation and potential significance for wound healing and the progression of periodontal disease. Oral Dis. 1996 Jun; 2(2): 155-66.
- Mariotti A, Cochran D. Characterization of fibroblasts derived from human periodontal ligament and gingiva. J Periodontol. 1990 Feb; 61(2): 103-11.
- Acosta A. El fibroblasto: su origen, estructura, funciones y heterogeneidad dentro del periodonto. Univ Odontol. 2006 Jun-Dic; 25(57): 26-33.
- Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, Wolff LF, Yoshie H. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. J Periodontol. 2003 Jun; 74(6): 849-57.
- Águila Gil B, Méndez Castillo R, González Roque C, Fernández Fernández D. Extracto acuoso de *Calendula officinalis*. Estudio preliminar de sus propiedades. Rev Cubana Plant Med. 2000 Abr; 5(1): 30-1.
- Yoshikawa M, Murakami T, Kishi A, Kageura T, Matsuda H. Medicinal flowers. III. Marigold. (1): hypoglycemic, gastric emptying inhibitory, and gastroprotective principles and new oleanane-type triterpene oligoglycosides, calendasaponins A, B, C, and D, from Egyptian *Calendula officinalis*. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2001 Jul; 49(7): 863-70.
- Matysik G, Wójciak-Kosior M, Paduch R. The influence of *Calendula officinalis* flos extracts on cell cultures, and the chromatographic analysis of extracts. J Pharm Biomed Anal. 2005 Jun 15; 38(2): 285-92.
- Hamburger M, Adler S, Baumann D, Förg A, Weinreich B. Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis*). Fitoterapia. 2003 Jun; 74(4): 328-38.
- Kalvatchev Z, Walder R, Garzaro D. Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. Biomed Pharmacother. 1997; 51(4): 176-80.
- Amirghofran Z, Azadbakht M, Karimi MH. Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. J Ethnopharmacol. 2000 Sep; 72(1-2): 167-72.
- Jiménez-Medina E, García-Lora A, Paco L, Algarra I, Collado A, Garrido F. A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual *in vitro* effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. BMC Cancer. 2006 May 5; 6:119.
- Bakó E, Deli J, Tóth G. HPLC study on the carotenoid composition of *Calendula* products. J Biochem Biophys Methods. 2002 Oct-Nov; 53(1-3): 241-50.
- Akihisa T, Yasukawa K, Oinuma H, Kasahara Y, Yamanouchi S, Takido M, Kumaki K, Tamura T. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. Phytochemistry. 1996 Dec; 43(6): 1255-60.

CORRESPONDENCIA

Gloria Cristina Moreno Abello
Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Odontología
Carrera 7 # 40-62
Bogotá, Colombia
gcmoreno@javeriana.edu.co

Nelly Stella Roa Molina
nelly.roa@javeriana.edu.co

Margarita Chaves Clavijo
margarita.chaves@javeriana.edu.co

Dabeiba Adriana García Robayo
garciad@javeriana.edu.co

María Alejandra Madrid Ahumada
maleja_86@hotmail.com

Luis Carlos Mahecha Donato
d_mahec@hotmail.com

Viviana Andrea Oviedo Peñaloza
vivi_oviedo@hotmail.com